Bio-Scale CHT-I カラム

取扱説明書

カタログ番号

751-0021、751-0023

751-0025、751-0027

ご使用の前に

本製品を正しく安全にお使いいただくために、ご使用の前に必ずこの取扱説明書を十分にお読みください。

お読みになったあとは、いつでも見られるところに必ず保管してください。

BIO-RAD

目次

第1章　Bio-Scale CHT-I カラムの特性

1.1　はじめに

Bio-Scale CHT-I カラムには CHT セラミックハイドロキシアパタイト Type I、粒径 10μm が充填されています。タンパク質やペプチド、ヌクレオチド等の生体物質を迅速に、再現性良く、高分離能な分離のために作られたカラムです。ベッドボリュームが 2ml、5ml、10ml 及び 20ml の4種類のカラムサイズをアプリケーションや用途に合わせてお選びいただくことができます。分離・精製のスケールアップも経済的に、容易に行うことが可能となります。

1.2　CHT セラミックハイドロキシアパタイト　Type I

CHTセラミックハイドロキシアパタイト Type I （CHT-I）担体はpIの高い塩基性タンパク質に比較的強い親和性を、pIの低いタンパクには比較的弱い親和性を示します。陽イオン性のCa^{2+}と陰イオン性のPO_4^{3-}で構成されるハイドロキシアパタイトは陽イオン交換と、カルシウムイオンが作用するキレート効果の混合型のイオン交換分離特性を示します。ハイドロキシアパタイトによる生体分子の精製はイオン交換法や疎水性クロマト法との組み合わせにより、特に精製ステップの最終段階で非常に有用となります。また、他法で分離・精製が難しかったアプリケーションに有効である報告例もあります。

この担体は、中性のリン酸バッファーを使用した非常に温和な条件でタンパク質を結合し、高濃度のリン酸バッファー、pH や NaCl 濃度のグラジエントで選択的に溶出が可能です。このように温和な溶出条件を用いることができるため、タンパク質を比較的失活せずに高い回収率で得ることが可能です。

Table 1. CHT-I カラムの仕様

	CHT2-I	CHT5-I	CHT10-I	CHT20-I
Column volume（ml）	2	5	10	20
Recommended max. protein loading（mg）	20	50	100	200
Recommended flow rate (ml/min)	0.5 – 3.0	0.5 – 5.0	0.5 – 7.0	0.5 – 10.0
Dynamic binding capacity（mg /Lysozyme/Column）	30	75	150	300
Static DNA binding capacity (mg calf thymus DNA)	0.20	0.5	1.0	2.0
Average particle size （μm）	10±3.0			
Nominal pore diameter（Å）	600 – 800			
Column dimension (mm)	7×52	10×64	12×88	15×113
Maximum operating pressure (psi/Mpa/bar)	1000 / 6.7 / 67	750 / 5.0 / 50	600 / 4.0 / 40	500 / 3.4 / 34

注意；バイオ·ラッドでは以下については推奨及び使用後の保証はしておりません。
・送液部にステンレススチール製パーツを含むクロマトグラフィーシステムの使用
・ハロゲン化塩等腐食性のある溶液の使用
カラムの耐久性、サンプルの活性等のためにも送液部がバイオコンパチブルな材質（セラミック、PEEK、チタン等）のクロマトグラフィーシステムをご使用ください。

＜CHT-I 担体の安定性＞

CHT-I 担体は pH 5.5-14 で安定であるため、アルカリ（2M NaOH）での洗浄も可能です。この担体は 6 M グアニジン塩酸と 8 M 尿素にも耐性があります。

Triton X-100、CHAPS、CTAB、1 % SDS といった界面活性剤やメタノール、エタノールやアセトニトリルのような有機溶剤も使用することができます。

EDTA や EGTA のようなカルシウムのキレート剤のご使用は、CHT のパフォーマンスが低下いたしますので、使用しないでください。

Trisバッファーのご使用はおすすめしません。Trisにキレート作用があり、CHT-I担体のカルシウム溶出の原因となります。

リン酸バッファー作成時、ナトリウム、カリウム共に水和物塩をご利用ください。（リン酸ニカリウムには水和物はありません）無水和物塩には試薬製造時に微量のピロリン酸が生成されることがあり、これもカルシウムのキレート作用を示す可能性が示唆されています。

4℃の条件下でクロマトグラフィーを行う時はリン酸カリウム塩をご使用ください。ナトリウム塩は低温では溶解度が低く、バッファー中で析出、流路の詰まりの原因になります。

バッファーに SDS を添加する時は、リン酸ナトリウム塩をご使用になり、低温条件での使用は避けてください。

Table 2. CHT の化学耐性

2M 水酸化ナトリウム	可	EDTA 等のキレート剤	不可
8M 尿素	可	シュウ酸、酢酸	不可
6M グアニジン塩酸	可	Tris バッファー	おすすめしません
100% エタノール/メタノール	可	Triton X-100、CHAPS、CTAB	可
100% アセトニトリル	可		
1% SDS	可		

第2章　Bio-Scale CHT-I カラムの使い方

2.1　ご使用前の準備

　カラムには1/4-28フィッティングが接続された状態で梱包されており、BioLogic DuoFlowに接続する場合にはそのままお使いいただけます。他社製の装置に接続する場合には、付属のフィッティングキットを用いて接続部分を作成しなおしていただくか、各種アダプター（第4章参照）をご使用ください。

1. カラム本体
2. フリット交換用パーツ（フリット（2）、ディストリビューションスクリーン（2）、O-リング（2）、フリットリムーバー（1））
3. 1/4×28 キャップ
4. M6 フィッティング（黒ナット（2）、青フェラル（2））
5. 10-32 フィッティング（赤ナット（2）クリーム色フェラル（2））

Fig.1　Bio-Scale CHT-I カラムの構成内容

　出荷時のカラムの状態は 20 % エタノール、5 mM リン酸バッファー（pH 6.8）中に保存されています。開封後、最初にお使いいただく時や、長期間保存後にお使いいただく時には必ず下記のプロトコールに従い使用前の処理をしてください。

　常にHPLCグレードの試薬を用い、バッファーは0.2-0.45 μｍのフィルターで濾過、脱気したものをご使用ください。また、この操作は推奨流速の 50 %以下の流速で実施してください。（Table 1.参照）

＜使用前の処理プロトコール＞

1. カラム容量の5倍量の水で洗浄します。
2. カラム容量の5倍量の低塩濃度バッファーで平衡化します。
   通常は 5-10 mM のリン酸バッファーpH6.8 を用います。
3. カラム容量の5倍量の高塩濃度のバッファーで洗浄します。
   通常は 500 mM リン酸バッファーpH 6.8 を用います。
4. カラム容量の5倍量の低塩濃度のバッファーで洗浄します。

　この後、カラムを実際に分離に用いる流速に設定し、開始バッファーで平衡化します。

2.2　サンプル調整

　サンプルの pH とイオン強度を適度に調製することは再現性のある結果を得るために必須条件です。最高の結果を得るためには、サンプルは開始バッファーに置換するか同じ濃度になるように希釈することが必要です。

　バッファーの置換はバイオスピカラム 6、バイオスピンカラム 30、 エコノパックカラム 10DG、バイオゲル P-6DG あるいはエコノパックカートリッジ P6 等をご使用になると便利です。お手持ちのサンプル量等により最適なものをご使用ください。

　サンプルは遠心・濾過（0.2-0.45 μｍ のフィルター）等によって必ず不溶物を除いてください。濁りがある、脂質を含んでいる等のサンプルのご使用はカラムの寿命を縮めることがあります。詳しくは参考文献 1 をご参照ください。

＜サンプル添加＞

推奨サンプル添加量については Table 2.を参照ください。ただし、この量はサンプルの成分によって大きく異なります。過剰のサンプル添加は、分離能低下、カラム寿命の低下の原因になります。大量のサンプルを処理する場合は、カラムサイズを大きくする、または数回に分けて分離・精製をしてください。

理想的な条件では、サンプルがカラムの上部に濃縮されて吸着します。サンプル添加量が多すぎると吸着体が広がり、比較的結合の弱い物質がより強い物質によって置き換わり、溶出時間の早い物質がより早く溶出されてしまい、分離がうまくいかないことがあります。

2.3 溶出条件

ハイドロキシアパタイトからの溶出は一般にリン酸濃度のステップワイズあるいはグラジェントによって行われます。アプリケーションによっては、リン酸濃度に加えて pH あるいは NaCl 濃度を変化させることも有効です。一般的には、目的のタンパクがグラジェントの低濃度で溶出されるような pH と初期の塩濃度を用いることが最も望ましいといえます。これは不安定なタンパクや、高濃度のリン酸バッファーの使用が望ましくない場合には特に重要です。

＜グラジェント容量とリン酸濃度＞

最初に溶出条件を検討する方法として、Bio-Scale CHT2-I カラムの場合、48 ml のグラジェントプロトコールで試されることをおすすめいたします。

＜プロトコール＞（Fig. 2 を参照）

流速： 2.0 ml/min

洗浄： サンプル添加後、開始バッファー6 ml（カラム容量の3倍）で非結合タンパクを除去。

溶出： 0.5 M リン酸 24 ml（カラム容量の 12 倍）を用いてグラジェント溶出。

洗浄： 6 ml（カラム容量の3倍）で洗浄します。

再平衡化： 12 ml（カラム容量の6倍）で再平衡化処理を行います。
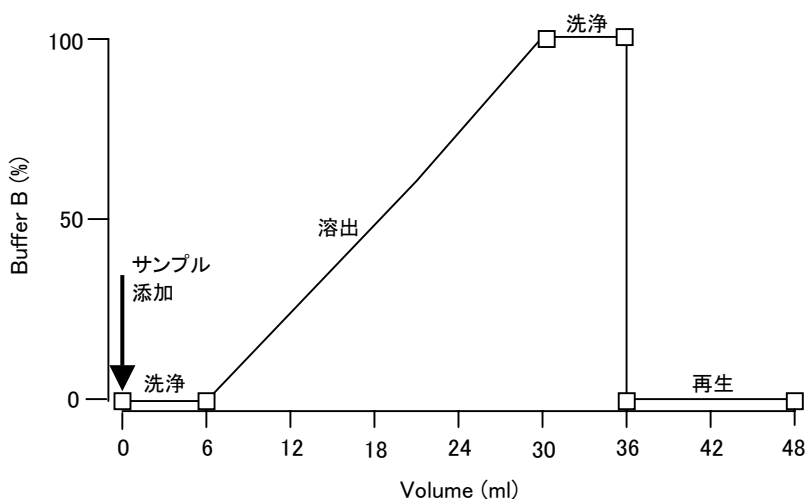
Fig.2 CHT2-I カラムを用いた溶出条件の検討

この条件で試験的に分離を行ない目的物質の溶出条件を決めます。その後、目的物質が最も効率良く分離できるようにグラジェント濃度と容量を決定します。通常は、1 ml のカラム容量あたり 10 ml から 20 ml のグラジェント容量が適しています。

また、グラジエントの傾きも分離結果に影響を与えます。勾配の急なグラジエントを用いるとピーク容量が比較的少ない結果がえられますが、ピーク間の間隔が短くなります。なだらかな勾配の場合には、よりよい分離を示しますがピークの容量がより多くなる傾向があります。

目的物質の吸着と溶出の最適条件が決まれば、CHT-I 担体によるサンプル濃縮効果が期待でき、含有量が低く、容量の大きなサンプルからの目的成分の回収にも有効となります。

ハイドロキシアパタイトの分離様式と応用方法について参考文献 2 および 3 に示されています。

2.4 界面活性剤の使用

通常タンパク質の精製に用いられる界面活性剤のほとんどが Bio-Scale カラムでご使用になれます（Table 2.参照）。ご使用に際しては、カラムの平衡化段階から界面活性剤添加バッファーをご使用ください。SDS 等イオン性界面活性剤は分離パターンに影響しますので、必要に応じて条件検討を行ってください。

グラジエント溶出時、ミセルの生成により問題がおきることもあります。この場合には、UV 吸収が突然高くなるという現象が起きます。臨海界面ミセル濃度（Critical micelle concentration、CMC）を保ってグラジエント操作を行ってください。

CHT-I 担体にて分離後、そのまま他のカラム等でクロマトグラフィーを行う場合（例えば疎水クロマト等）には界面活性剤が影響を与えることがありますので界面活性剤の選択にはご注意ください。（参考文献 1、4 および 5 参照）

2.5 塩化カルシウムの影響

塩化カルシウムをバッファーに添加すると、酸性タンパク質の結合量が大きくなることがあります。しかし、濃度が高すぎますとカルシウムイオンがバッファー中のリン酸イオンと難溶性のリン酸カルシウムを生成し、カラムの目詰まりの原因となります。ご使用の際は充分にご注意ください。

例；pH 7.0 のリン酸バッファーに塩化カルシウムを添加する場合

{ pH 7.0 におけるリン酸カルシウムの溶解度は 3×10^{-6} M
  pH 7.0 のリン酸バッファー　10 mM　→　500 mM のグラジエントをかける

→10　mM リン酸バッファーには 0.3 mM、500 M リン酸バッファーには 0.00 6mM の塩化カルシウムを添加することができます。

参考；　pH 6.0 におけるリン酸カルシウムの溶解度は 3×10^{-5} M、
pH 8.0 におけるリン酸カルシウムの溶解度は 3×10^{-7} M

2.6 クロマトグラフィーのプレラン

サンプルをカラムにアプライする前に、カラム洗浄をしてください。カラムをはじめてご使用される場合は「2.1　ご使用前の準備」をご参照ください。

サンプルなし、バッファーのみで一度グラジエントをかけておくことをおすすめしています。前回のクロマトグラフィーで用いた界面活性剤等の成分が残っており、それらが溶出されるときシャープな UV 吸収ピークとして検出されることがあります。このピークが他のサンプルの吸収と重なり、クロマトグラムの分析を困難になることを防ぎます。

第3章 Bio-Scale CHT-I カラムの取扱方法

3.1 カラムの洗浄

バッファーは0.2 – 0.45 μm のフィルターで濾過し、細かなごみ等を取り除いてご使用ください。これにより、カラムのパフォーマンス・ライフタイムをより長く保つことができます。通常、洗浄は 0.5 M リン酸バッファーを用い、結合している余分な物質を除去します。しかし、明らかなパフォーマンス低下（バックプレッシャーが上がる、分離能が悪くなる等）の場合には、次のような方法を試みてください。

下記の操作中、Table 1 の推奨流速の最大値の 25%を超えないように流速の設定をしてください。また、最大圧力を超えないよう、ご留意ください。

1. カラム容量の2倍量の 2.0 M NaCl または KCl 水溶液を流した後、カラム容量の3倍量の精製水または低塩濃度バッファーを流します。通常は 5-10 mM のリン酸バッファーpH 6.8 を用います。
2. カラム容量の1倍量の 2.0 M NaOH 水溶液を流した後、カラム容量の3倍量の精製水または低塩濃度バッファーを流します。
3. トップフリットを交換し、エアが入らないようにベッド表面を整え、カラム容量の3倍量の平衡化バッファーを流します。

脂質のコンタミネーションの場合、カラム容量の1倍量のメタノール、カラム容量の3倍量の精製水、2倍量以上の0.5M リン酸バッファーを順番に流して洗浄します。その後、上記 3.を行います。

疎水性の強いタンパク質等が高塩濃度で変性、目詰まりしているような場合には、6M 尿素あるいは8M 塩酸グアニジン溶液を流した後、精製水または低塩濃度バッファーを流してから上記の洗浄をする方法もあります。

3.2 ベッドの高さ調整

あるバッファー組成の条件下、高流速または長時間継続して使用する場合、担体の充填がより密になり、ベッド上部とフリットの間に隙間ができることがあります。通常、その隙間はフリットがベッド上部に接するまでロックナットを時計回りに回して隙間を無くせば問題なくお使いいただけます。

高流速のために隙間ができた場合、ポンプを停止し、上部のフィッティングを緩めれば改善することもあります。ロックナットを締めて隙間をなくしたら、クロマトグラフィーを再開する時はしっかりとフィテッィングを接続し、ポンプを作動させてください。

長期間の継続的な使用による場合はトップフリットを交換してください。詳細は「3.3 フリットの交換」をご参照ください。

3.3 フリットの交換

トップフリットは繰返し使用した後やバックプレッシャーが高くなってきたら交換時期です。ご購入時、フリットリムーバー（1個）、ポリプロピレン製フリット（2個）、ディストリビューションスクリーン（2個）が添付されていますので、こちらをお使いください。

ディストリビューションスクリーンはカラム表面全体にサンプルが行き渡るのを助け、フリットの目詰まりを防ぐ役割を果たします。フリットを交換する時にはこのスクリーンも必ず同時に交換してください。

具体的なフリット交換の方法については、Fig. 3 をご覧ください。
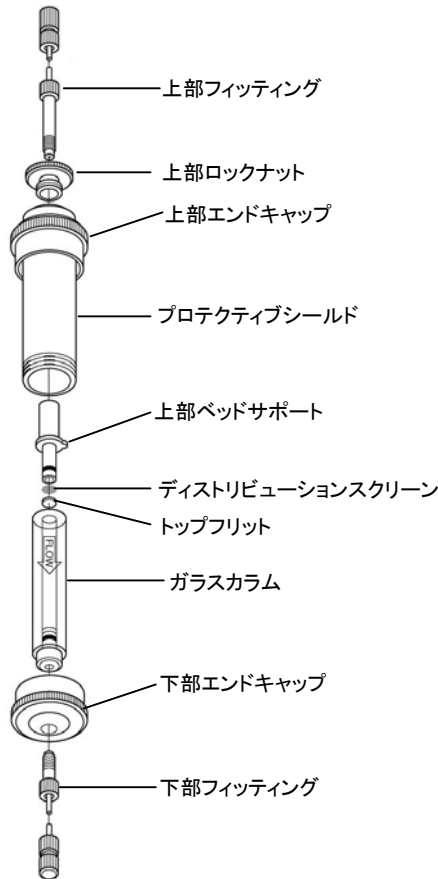
Fig. 3 トップフリットの交換（カラムの分解図）

＜トップフリットの交換方法＞

1. 上下のフィッティングをはずします。
2. 上部ロックナットをはずします。
3. プロテクティブシールドから下部エンドキャップをはずし、ガラスカラムを取り出します。
4. 上部ベッドサポートをガラスカラムから引き出します。
5. フリットリムーバーの尖っている先をフリットに差し込み、スライドさせてディストリビューションスクリーンとフリットを取り外します。
6. 5ml のバッファーをベッドの上にのせます。新しいフリットとスクリーンをガラスカラムの筒の中におきます。上部ベッドサポートを注意深くガラスカラムに押し込みながらフリットとスクリーンをベッド面まで押し下げます。
7. ガラスカラムをプロテクティブシールドに差し込み、上部エンドキャップを装着します。装着時、上部エンドキャップとベッドサポートのガイド部分を合わせるようにします。プロテクティブシールドに下部エンドキャップを装着します。上部フィッティングを取り付け、トップフリットがベッドの上面にくるまで上部ロックナットを回して閉めます。
8. クロマトグラフィーシステムに接続し、2ml/min で 5-10 分間バッファーを流し、ベッド上面の隙間、バッファー漏れ等が無いか確認します。

3.4 Top-Off Resin キット

ベッド上部の担体の汚れがひどくなると、前述の洗浄をしてもパフォーマンスが戻らなくなります。この場合、Top-Off Resin キット(別売)を用いて、ベッド上部の担体を数 mm 取り除き、新しい担体を充填します。

3.5 保存条件

長期間保存する際は、前述の方法で洗浄した後、微生物の繁殖を防ぐため、カラム容量の 3 倍の 20 % エタノール、5 mM リン酸バッファー(pH 6.8)あるいは 0.02-0.05% アジ化ナトリウム、5 mM リン酸バッファー(pH 6.8)を流します。カラムをクロマトグラフィーシステムから外した後、カラムが乾燥しないように適当なフィッティングを接続し、常温で保存します。

冷凍保存は厳禁です。

3.6 参考文献

1. Guide to Sample Preparation. Bio-Rad Laboratories Technical Bulletin # 1322.

2. Hydroxylapatite. T. L. Brooks (Calbiochem Biochemicals).

3. HPLC of Proteins on an Hydroxyapatite Column. T. Kadoya et al, (1988), *J. Liquid Chromatography*, 11, No 14, 2951-2967.

4. Ceramic Hydroxyapatite HPLC of Complexes Membrane Protein and Sodium Dodecyl Sulfate. T. Horigome et. al., (1989), *European Journal of Biochemistry*, 186, 63-69.

5. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry. *J. Neugebauer* (Calbiochem Biochemicals).

第4章　Product Information

カタログ番号	品名
751-0021	Bio-Scale CHT2-I カラム カラム本体(2ml、1/4×28 フィッティング付)、 1/4×28 キャップ(2)、10-32 フィッティング(赤ナット 2、クリーム色フェラル 2)、M6 フィッティング(黒ナット 2、青フェラル 2) フリット(2)、ディストリビューションスクリーン(2)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)、
751-0023	Bio-Scale CHT5-I カラム カラム本体(5ml、1/4×28 フィッティング付)、 1/4×28 キャップ(2)、10-32 フィッティング(赤ナット 2、クリーム色フェラル 2)、M6 フィッティング(黒ナット 2、青フェラル 2) フリット(2)、ディストリビューションスクリーン(2)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)、
751-0025	Bio-Scale CHT10-I カラム カラム本体(10ml、1/4×28 フィッティング付)、 1/4×28 キャップ(2)、10-32 フィッティング(赤ナット 2、クリーム色フェラル 2)、M6 フィッティング(黒ナット 2、青フェラル 2) フリット(2)、ディストリビューションスクリーン(2)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)、
751-0027	Bio-Scale CHT20-I カラム カラム本体(20ml、1/4×28 フィッティング付)、 1/4×28 キャップ 8(2)、10-32 フィッティング(赤ナット 2、クリーム色フェラル 2)、M6 フィッティング(黒ナット 2、青フェラル 2) フリット(2)、ディストリビューションスクリーン(2)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)、
751-0029	Top-off Resin キット CHT-I 補充用 CHT-I 担体(1ml)、フリット(各カラムサイズ分 5 枚ずつ)、ディストリビューションスクリーン(各カラムサイズ分 5 枚ずつ)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)
751-0091	Bio-Scale 2 パーツキット フリット(5 枚)、ディストリビューションスクリーン(5 枚)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)
751-0093	Bio-Scale 5 パーツキット フリット(5 枚)、ディストリビューションスクリーン(5 枚)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)
751-0095	Bio-Scale 10 パーツキット フリット(5 枚)、ディストリビューションスクリーン(5 枚)、O-リング(2)、フリットリムーバー(1)
751-0097	Bio-Scale 20 パーツキット
750-0561	Tefzel アダプター 1/4-28-M6、2 個
750-0561HPL	アダプター 1/4-28-10-32、2 個
750-0564	BioLogic 用 HPLC カラムフィッティング